การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีและความสำคัญทางคลินิก

ศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์*

บทนำ

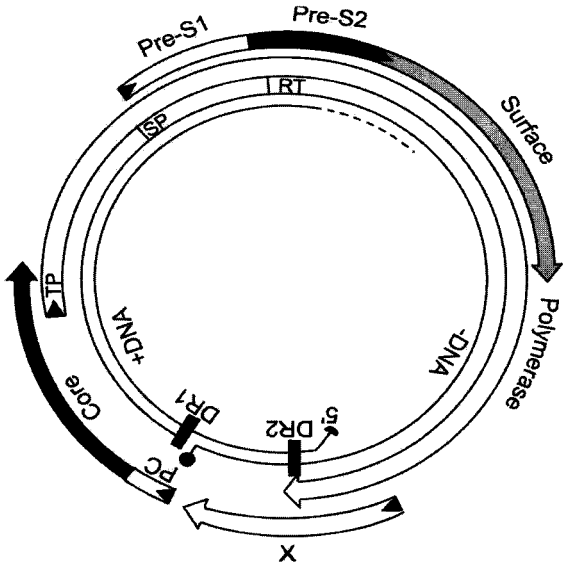
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus) เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของโรคตับอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis) ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) แม้ว่าในปัจจุบันมียาต้านไวรัส (antiviral drugs) หลายชนิดที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม การรักษาจนหายขาดจากการติดเชื้อ (cure) ยังมีอัตราที่ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไวรัสรูปแบบเฉพาะที่เรียกว่า covalently closely circular DNA (cccDNA) ซึ่งสามารถอยู่ในเซลล์ตับได้เป็นเวลานานและทำให้การขจัดเชื้อไวรัสให้หมดเป็นไปได้ยาก ความรู้พื้นฐานทางอณูไวรัสวิทยา (molecular virology) ของไวรัสตับอักเสบบีจะช่วยทำให้ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคตับอักเสบและการดำเนินของโรคดีขึ้น ซึ่งจะทำให้การวินิจฉัย การป้องกันและการรักษาโรคตับอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ยีโนมของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นไวรัสชนิดดีเอนเอที่อยู่ใน Family Hepadnaviridae และ genus orthohepadnavirus ในปัจจุบันมีการจัดแบ่งกลุ่มเป็นอย่างน้อย 8 สายพันธุ์ (genotypes A ถึง H)[1] โดยมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอนเอแบบสายคู่วงกลมที่ไม่สมบูรณ์ [partially double-stranded DNA หรือ relaxed-circular DNA (rcDNA)] ซึ่งมีสายลบ (L หรือ minus strand) ที่มีความยาวเต็มตลอดยีโนม ขนาดประมาณ 3200 นิวคลีโอไทด์และสายบวก (S หรือ plus strand) ที่มีขนาดไม่แน่นอนโดยมีความยาวประมาณร้อยละ 20-80 ของสายลบ[2] (รูปที่ 1)

สายลบประกอบด้วย 4 open reading frames (ORFs) ซึ่งทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัสได้แก่ S, C, X และ P เนื่องจากยีโนมของไวรัสมีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับไวรัสชนิดดีเอนเออื่น ๆ ดังนั้นทั้ง 4 ส่วน นี้จึงมีลักษณะที่ซ้อนกัน (overlapping ORFs) โดยเฉพาะส่วน P ซ้อนอยู่กับทั้ง 3 ส่วนที่เหลือ

* คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330



รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี

S-ORF ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ผิว (surface protein, HBsAg) ประกอบด้วย S, Pre - S2 และ Pre - S1 gene

C-ORF ทำหน้าที่สร้าง hepatitis B c antigen (HBcAg หรือ core protein) และ hepatitis B e antigen (HBeAg)

P-ORF ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ DNA polymerase/ reverse transcriptase

X-ORF ทำหน้าที่สร้าง hepatitis B x antigen (HBxAg)

การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นไวรัสที่มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (rate of spontaneous mutations) สูงกว่าไวรัสชนิดดีเอนเอื่น ๆ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสต้องอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการเพิ่มจำนวนของ retroviruses เช่น ไวรัสเอชไอวีที่มีอัตราการกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutations) สูง โดยไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 1 นิวคลีโอไทด์/10,000 เบส/จำนวนปีที่ติดเชื้อ[3] เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่ค่อนข้างสูง (high viral replication) จึงทำให้มีจำนวนไวรัสในเลือดของผู้ที่ติดเชื้อมากกว่า 10^8-10^{10} อนุภาค/มล. ถ้าคำนวณจากครึ่งอายุ (half life) ของเชื้อไวรัสซึ่งอยู่ระหว่าง 1-2 วัน พบว่าในแต่ละวันจะมีจำนวนไวรัสในเลือดมากกว่า 10^{11} อนุภาค[4] ดังนั้นในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจึงมีโอกาสพบเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์ (mutant strains) ได้บ่อยโดยเชื้อไวรัสเหล่านี้มีโอกาสเปลี่ยนไปเป็นสายพันธุ์เด่น (dominant strains) หรือเป็นประชากรกลุ่มใหญ่ (major population) แทนที่เชื้อไวรัสเดิมที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (wild-type strains) ถ้าหากว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อความอยู่รอดของเชื้อไวรัส เช่น ทำให้เชื้อไวรัสมีความสามารถในการหลบหลีกจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายดีขึ้น เพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็วหรือมีความทนทานต่อยาต้านไวรัสสูงขึ้น

การกลายพันธุ์ระดับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเปลี่ยนแปลงเบสของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของยีน (point mutation) ซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวแบ่งเป็น 1) การกลายพันธุ์ที่ไม่มีการเปลี่ยนรหัสของกรดอะมิโน (silent mutation) 2) การกลายพันธุ์ที่ทำให้รหัสของกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ซึ่งอาจมีผลหรือไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์นั้น ๆ (missense mutation) 3) การกลายพันธุ์ที่ทำให้รหัสของกรดอะมิโนเดิมเปลี่ยนเป็น stop codon ซึ่งทำให้โปรตีนหรือโพลีเปปไทด์นั้น ๆ สูญเสียการทำงาน (nonsense mutation) การกลายพันธุ์แบบอื่นที่พบได้น้อยกว่าได้แก่ deletion ซึ่งเป็นการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งหรือบางส่วนของยีนและ insertion ซึ่งเป็นการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของยีน

การกลายพันธุ์ระดับยีนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญทางคลินิกได้แก่ precore และ basic core promoter

(BCP) mutations ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg การกลายพันธุ์ของ pre-S gene โดยเฉพาะ pre-S deletion การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีนได้แก่ '*a*' determinant mutations และการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสกลุ่ม nucleos(t)ide analogues (NA) ได้แก่ polymerase gene mutations

1 การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg

HBeAg เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) พบว่าโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ (anti-apoptosis)[5] การศึกษาสัตว์ทดลอง (animal model) พบว่าโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เป็น immune tolerogen โดยทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อการติดเชื้อไวรัสลดลงเนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับ HBcAg หรือ core protein ที่เป็นเป้าหมายหลักของระบบภูมิคุ้มกัน (immune target)[6] ดังนั้น HBeAg จึงทำหน้าที่เป็นโปรตีนเสริม (accessory protein) ที่มีความสำคัญในวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

ในทางคลินิกนิยมจัดแบ่งโรคตับอักเสบแบบเรื้อรังตามผลของการตรวจพบ HBeAg ในเลือดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มที่ตรวจพบ HBeAg (HBeAg-positive chronic hepatitis) และกลุ่มที่ตรวจไม่พบ HBeAg (HBeAg-negative chronic hepatitis) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ของกลุ่มแรกมักมีระดับ HBV DNA ในเลือดสูงเนื่องจากการตรวจพบ HBeAg ในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีจำนวนเชื้อไวรัสมากในเลือด (high levels of viral replication) ส่วนผู้ป่วยกลุ่มหลังอาจมีระดับ HBV DNA ในเลือดสูงหรือไม่ก็ได้เช่นในระยะ inactive HBV carrier state มักมีระดับ HBV DNA ค่อนข้างต่ำหรืออาจตรวจไม่พบเลย ส่วนในระยะ reactivation มักมีระดับ HBV DNA ในเลือดที่ค่อนข้างสูง สาเหตุที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสแต่ตรวจไม่พบ HBeAg เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งทำให้เชื้อไวรัสไม่สามารถสร้างแอนติเจนชนิดนี้ได้ตามปกติ การกลายพันธุ์ดังกล่าวเป็นได้ 2 ตำแหน่งคือ 1) เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง basic core promoter (BCP) ซึ่งควบคุมขบวนการถอดรหัส (transcription) ของดีเอนเอทำให้การสร้างแอนติเจนลดลงกว่าปกติ (decreases of HBeAg production) 2) เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง precore ซึ่งควบคุมการแปลรหัส (tran-slation) ในการสังเคราะห์โปรตีนเป็นผลทำให้ไม่สามารถสร้างแอนติเจนนี้ได้เลย (abolishes HBeAg production)[7] (รูปที่ 2)

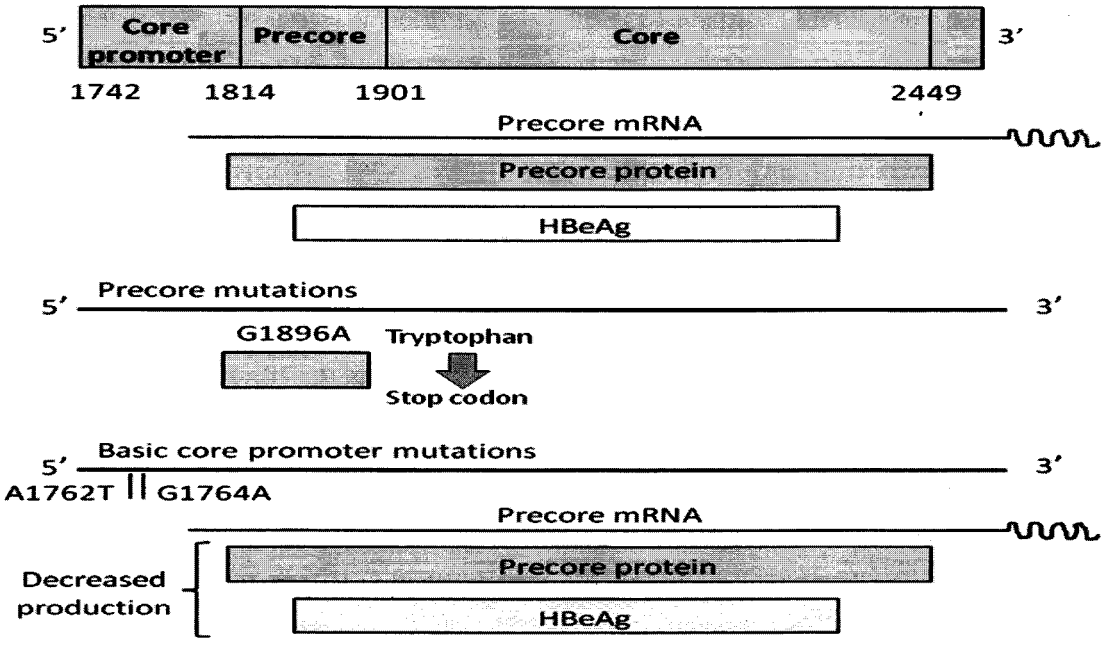
Precore mutations

มีรายงานครั้งแรกในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียนที่พบว่าผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมีระดับของ HBV DNA ในเลือดสูงและมีพยาธิสภาพของตับที่รุนแรงแต่ตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือดซึ่งการศึกษาต่อมาพบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในส่วนของ precore gene ทำให้ไม่สามารถสร้าง precore protein ซึ่งเป็นโปรตีนเริ่มต้น (precursor) ของ HBeAg ได้ตามปกติ การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดคือการเปลี่ยนของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1896 (หรือ codon ที่ 28) จาก G เป็น A (G1896A) ทำให้การสร้างกรดอะมิโนเปลี่ยนจากทริปโตเฟน (tryptophan) เป็น stop codon และไม่มีการสร้าง precore protein เกิดขึ้น (รูปที่ 2)[7] อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ไม่มีผลต่อการสร้าง HBcAg เพราะ HBcAg และ HBeAg สังเคราะห์จาก mRNA ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการกลายพันธุ์แบบนี้ทำให้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ การกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น ๆ ที่ทำให้ไม่มีการสร้าง HBeAg ได้แก่การเปลี่ยนจาก G เป็น A ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1898 (G1898A) และ 1989 (G1989A) หรือการเปลี่ยนจาก C เป็น T ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1856 ของ codon ที่ 15 (C1856T) และการเปลี่ยนจาก A เป็น C ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1814 (A1814C) ซึ่งเป็น start codon[2,8]

นอกจากนี้การเปลี่ยนของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1899 (G1899A) ซึ่งไม่มีผลต่อการสร้าง HBeAg เป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะพบร่วมกับ G1896A[9]

ความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G1896A มีความแตกต่างตามภูมิภาคของโลกเช่นการกลายพันธุ์แบบนี้พบได้บ่อยในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน (อิตาลี กรีซ และอิสราเอล) และเอเชีย (ฮ่องกง ไต้หวันและญี่ปุ่น) โดยมีอัตราความชุกประมาณร้อยละ 50-80 และ 40-55 ตามลำดับ[10] การศึกษาที่ศูนย์วิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยพบว่ามีอัตราความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G1896A ในประชากรไทยประมาณร้อยละ 25-35[11, 12] การกลายพันธุ์แบบนี้พบได้ไม่บ่อยในประชากรของประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรปตะวันตก ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่พบมากในภูมิภาคนั้น ๆ กล่าวคือการกลายพันธุ์แบบ G1896A พบได้บ่อยในเชื้อไวรัส genotype B, C, D และ E แต่พบได้ค่อนข้างน้อยในเชื้อไวรัส genotype A, F และ H[13]

การศึกษาในระยะแรก ๆ พบว่าการกลายพันธุ์แบบ G1896A มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตับวายอย่างเฉียบพลัน (fulminant hepatitis) และโรคตับอักเสบแบบเรื้อรังที่มีความรุนแรงทางพยาธิวิทยา (severe chronic hepatitis) การศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าการกลายพันธุ์แบบนี้พบได้ในผู้ป่วยกลุ่มต่าง ๆ รวมทั้งผู้ป่วยที่มีการดำเนินของโรคตับไม่รุนแรงหรือไม่มีอาการ (asymptomatic carriers) นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของ precore กับการเกิดโรคมะเร็งตับยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเช่นการศึกษาจากประเทศไต้หวันพบว่าการกลายพันธุ์แบบ G1896A เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[14] ในขณะที่การศึกษาอื่นจากประเทศเดียวกันพบว่าการกลายพันธุ์แบบนี้ลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ[15] ดังนั้นในปัจจุบัน



รูปที่ 2 การกลายพันธุ์ของ precore และ basic core promoter (BCP) ที่ทำให้การสร้าง HBeAg ไม่เป็นไปตามปกติ (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 7)

จึงเชื่อว่าการกลายพันธุ์แบบ G1896A ของเชื้อไวรัสไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับอักเสบและความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ

Basic Core promoter mutations

Basic Core promoter (BCP) อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1742-1849 เนื่องจาก BCP อยู่ใน X ORF ดังนั้นเมื่อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในส่วนนี้จึงมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ x protein ร่วมด้วย เนื่องจาก BCP อยู่ในตำแหน่งที่ซ้อนกับ enhancer II (Enh II) ดังนั้นการกลายพันธุ์ในส่วนนี้จึงทำให้การทำงานของ Enh II ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่กำหนดการสร้างอาร์เอนเอ (transcriptional factors) ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ตับเช่น hapatocyte nuclear factor-1(HNF-1) ลดน้อยลงเป็นผลทำให้มีการสร้าง precore mRNA และ HBeAg ลดลงกว่าปกติประมาณร้อยละ 70[9,10] อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ไม่มีต่อการสร้าง core และ polymerase proteins

ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้บ่อยที่สุดในส่วนของ BCP คือการเปลี่ยนของเบส 2 ตำแหน่งพร้อมกัน (double mutations) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 และ 1764 โดยมีการเปลี่ยนจาก A เป็น T ร่วมกับการเปลี่ยนจาก G เป็น A (A1762T และ G1764A) ตามลำดับ แม้ว่าการกลายพันธุ์แบบนี้พบได้ในผู้ป่วยที่มีการดำเนินของโรคตับไม่รุนแรงหรือไม่มีอาการ ข้อมูลส่วนใหญ่จาก cross-sectional study และ case-control study บ่งชี้ว่าเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์แบบนี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของตับอักเสบโดยเฉพาะการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ กลไกการเกิดตับที่รุนแรงนี้มีหลายสมมุติฐานได้แก่ 1) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้เชื้อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น[16] 2) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้การตอบสนองของ T lymphocytes ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง[17] 3) การกลายพันธุ์แบบนี้ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ x protein ซึ่งเป็นผลทำให้มีการยับยั้งการทำงานของ p53 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) และเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งตับ (hepatic carcinogenesis)[18] เนื่องจาก A1762T และ G1764A พบในเชื้อไวรัส genotype C ได้บ่อยกว่าใน genotype B ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การติดเชื้อไวรัส genotype C มีการดำเนินของโรคที่รุนแรงกว่าการติดเชื้อไวรัส genotype B

นอกจากการกลายพันธุ์แบบ A1762T และ G1764A แล้วการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น ๆ ของ BCP ที่พบได้บ่อยได้แก่การเปลี่ยนจาก T เป็น C หรือ G ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1753 (T1753C/G) ซึ่งมักพบร่วมกับ A1762T และ G1764A นอกจากนี้การกลายพันธุ์ในส่วนของ Enh II ซึ่งอยู่ในตำแหน่งใกล้กันที่พบได้บ่อยคือการเปลี่ยนจาก C เป็น T ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1653 (C1653T) ข้อมูลการศึกษาหลายรายงานต่อมาพบว่าการกลายพันธุ์แบบ T1753C/G และ C1653T มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคตับอักเสบที่รุนแรงและการเกิดมะเร็งตับเช่นกัน[19]

การศึกษาแบบ case-control study ในประชากรไทยเพื่อเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีแบบต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง (direct sequencing) ในส่วนของ EnhII/BCP/precore (ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1287-2038) ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นตับอักเสบแบบเรื้อรังแต่ไม่เป็นมะเร็งตับ จำนวนกลุ่มละ 60 คน โดยทั้งสองกลุ่มมีอายุเฉลี่ยและเพศไม่แตกต่างกันรวมทั้งมีผลการตรวจพบ HBeAg และสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเหมือนกัน การศึกษาพบว่ากลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A, T1753C/G และ G1899A พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ และ C1653T พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มมะเร็งตับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอัตราความชุกของ G1896A ไม่แตกต่างกันระหว่างทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 1)[20]

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วน EnhII/BCP/PC ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ (HCC) และกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ[20]

Nucleotide sequences of EnhII/BCP/PC genes	Control patients (n=60)	Patients with HCC (n=60)	*P*
G1613A	18 (30.0)	24 (40.0)	0.339
C1653T	7 (11.7)	16 (26.7)	0.062
T1753C/A	14 (23.3)	26 (43.3)	0.02
A1762T/G1764A	33 (55.0)	53 (88.3)	<0.001
C1766T/T1768A	3 (5.0)	10 (16.7)	0.075
A1846T/C	14 (23.3)	16 (26.7)	0.833
T1858C	1 (1.7)	3 (5.0)	0.619
G1896A	17 (28.3)	26 (43.3)	0.127
G1899A	5 (8.3)	21 (35.0)	0.001

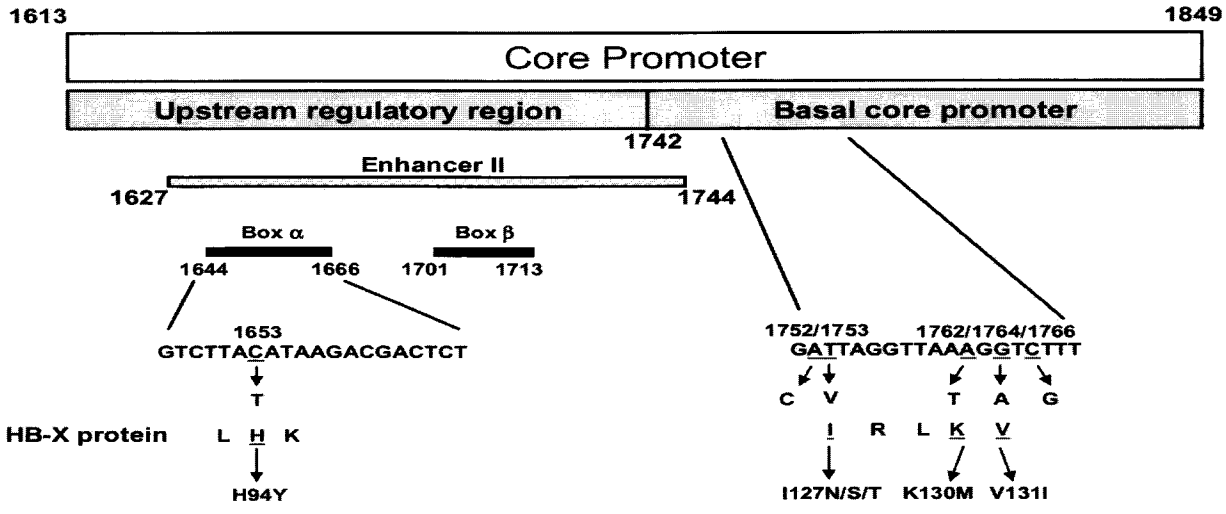
Data are expressed as no (%)

จากการศึกษาดังกล่าวเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไปด้วยวิธี multivariate analysis พบว่าการมีตับแข็งร่วมด้วยเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดต่อการเป็นมะเร็งตับโดยมีค่า odds ratio เท่ากับ 8.44 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 2.65 ถึง 26.84) ในขณะที่การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A และ G1899A เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับมากขึ้นโดยมีค่า odds ratio เท่ากับ 3.56 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.16 ถึง 10.89) และ 3.54 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.09 ถึง 11.47) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)[20] ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์แบบ G1896A ของเชื้อไวรัสไม่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ ส่วนการกลายพันธุ์แบบ A1762T/G1764A และ G1899A มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรที่ศึกษา อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในลักษณะดังกล่าวในประชากรไทยเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตเพื่อสนับสนุนข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้

2. การกลายพันธุ์ของ X gene

X protein ซึ่งสร้างจาก X gene ทำหน้าที่เป็น transcriptional trans-activator ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับเพราะโปรตีนนี้ สามารถยับยั้งการทำงานของ p53 รวมทั้งปัจจัยที่กำหนดการสร้างอาร์เอนเอต่าง ๆ[21] เนื่องจาก x gene มีส่วนที่ซ้อนกับ core promoter ดังนั้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนในส่วนของ core promoter จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ x protein ร่วมด้วยเช่น BCP double mutations (A1762T/G1764A) ทำให้มีการเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนของ x protein จากไลซีน (lysine, K) เป็นเมไธโอนีน (methionine, M) ที่ตำแหน่ง 130 (K130M) และเปลี่ยนจากเวลีน (valine, V) เป็นไอโซลิวซีน (isoleucine, I) ที่ตำแหน่ง 131 (V131I) การกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่น ๆ ในส่วนของ core promoter ที่พบได้บ่อยได้แก่ T1753C/G และ C1653T ทำให้เกิดการเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนของ x protein แบบ I127N/S/T และ H94Y ตามลำดับ (รูปที่ 3)[22]

การศึกษาแบบ case-control study ในประชากรไทยเพื่อเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในส่วนของ x gene ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เป็นมะเร็งตับจำนวน



รูปที่ 3 การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีที่พบได้บ่อยในส่วนของ Core promoter และ x protein (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 22)

กลุ่มละ 60 คนด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าการกลายพันธุ์แบบ K130M, V131I และ I127T/N พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน H94Y พบได้บ่อยกว่าในกลุ่มมะเร็งตับแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)[20] มีข้อสังเกตว่าความชุกของการกลายพันธุ์แบบอื่น ๆ เช่น A36T, P38S และ A44L ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่เป็นมะเร็งตับกับกลุ่มควบคุม ซึ่งข้อมูลการศึกษาในประชากรไทยนี้มีความแตกต่างจากหลายรายงานในต่างประเทศที่พบว่าการกลายพันธุ์แบบ A36T, P38S และ A44L พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าการเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนของ x protein ในบางตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย

3. การกลายพันธุ์ของ pre-S1 และ pre-S2 genes

Pre-S gene ของไวรัสตับอักเสบบีซึ่งประกอบด้วย pre-S1 และ pre-S2 เป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunogenicity) เนื่องจากประกอบด้วยส่วนที่เป็น epitopes หรือ antigenic determinant ของ B และ T lymphocytes[9, 10] การกลายพันธุ์ในบริเวณนี้ส่วนใหญ่เป็นแบบ deletion ซึ่งมีความชุกของการกลายพันธุ์แตกต่างไปตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก จากการศึกษาตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อใน 12 ประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยพบว่ามีอัตราความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วนนี้ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 36 ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวพบว่าประชากรไทยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์ดังกล่าวประมาณร้อยละ 10.5[23]

ตารางที่ 2 Multivariate analysis ของปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ[20]

Factor	Odds ratio (95% confidence interval)	*P*
A1762T/G1764A mutations	3.56 (1.16-10.89)	0.026
G1899A mutation	3.54 (1.09-11.47)	0.034
Presence of cirrhosis	8.44 (2.65-26.84)	<0.001

การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S ด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างเลือด 147 ตัวอย่างที่รวบรวมจากกลุ่มประชากรทั่วไปใน 4 ภาคของประเทศเมื่อปีพ.ศ. 2547 พบว่ามี 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.5) ที่มีการกลายพันธุ์แบบนี้[24] ซึ่งเป็นอัตราความชุกที่ใกล้เคียงกับการศึกษาดังกล่าวข้างต้น เมื่อจัดแบ่งตามลักษณะของการกลายพันธุ์พบว่า pre-S2 deletion เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด (ร้อยละ 4.1) รองลงมาคือ pre-S2 start codon mutation (ร้อยละ 2.9) pre-S2 deletion และ start colon mutation ร่วมกัน (ร้อยละ 2) และ pre-S1 deletion (ร้อยละ 0.7) (รูปที่ 4) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศเกาหลีที่พบว่า pre-S2 deletion และ pre-S2 start colon mutations เป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด[23,25] มีข้อสังเกตว่าการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S พบได้บ่อยกว่าในผู้ที่ติดเชื้อไวรัส genotype C เมื่อเทียบกับ genotype B นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบนี้พบได้บ่อยขึ้นในผู้สูงอายุกล่าวคืออายุของผู้ติดเชื้อไวรัสที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S เฉลี่ยประมาณ 41 และ 32 ปีตามลำดับซึ่งการศึกษาในประชากรไทยนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในต่างประเทศที่แสดงว่าการกลายพันธุ์แบบนี้พบได้บ่อยขึ้นตามอายุของผู้ติดเชื้อไวรัส[26]

มีการศึกษาหลายรายงานที่แสดงว่าการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S โดยเฉพาะ pre-S1 deletion หรือ pre-S2 deletion พบได้บ่อย (ประมาณร้อยละ 60) ในเลือดและเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับและมีส่วนสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ[27] การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า pre-S1 หรือ pre-S2 deletions ทำให้การสร้าง large protein หรือ large hepatitis B surface protein (LHBs) ไม่เป็นไปตามปกติและมีการสะสมโปรตีนที่ผิดปกตินี้ในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) มากขึ้น การสะสมของโปรตีนดังกล่าวเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดความเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) และมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ผลที่ตามมาคือดีเอนเอของเซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นและอาจนำไปสู่สภาวะขาดความเสถียรของยีโนม (genomic instability) นอกจากนี้ LHBs ยังกระตุ้นการทำงานของ cyclooxygenase-2 และ cycline A ซึ่งทำให้เซลล์ตับมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นซึ่งผลรวมต่าง ๆ เหล่านี้เป็นกลไกที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งตับในเวลาต่อมา[27]

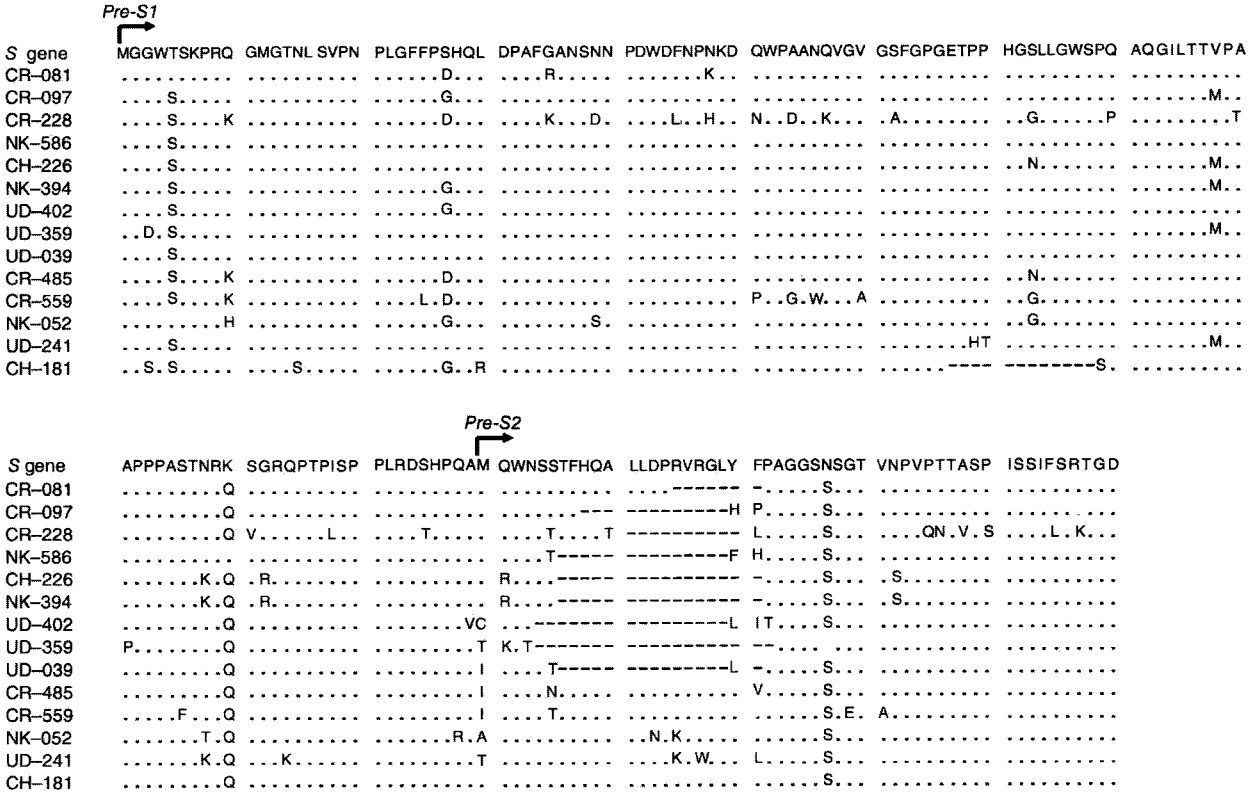
4. การกลายพันธุ์ของ S gene (‘*a*’ determinant mutations)

HBsAg เป็นโปรตีนที่สร้างจาก S gene ทำหน้าที่เป็น envelope ของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ส่วนของโปรตีน

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในส่วนของ x protein ของไวรัสตับอักเสบบี ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ (HCC) และกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งตับ[20]

Amino acid sequences of x protein	Control patients (n=60)	Patients with HCC (n=60)	*P*
A36T	42 (70.0)	41 (68.3)	0.843
P38S	2 (3.3)	0 (0)	0.496
A44L	14 (23.3)	20 (33.3)	0.311
H94Y	7 (11.7)	16 (26.7)	0.062
I127T/N	18 (30.0)	39 (65.0)	<0.001
K130M	33 (55.0)	51 (85.0)	<0.001
V131I	33 (55.0)	52 (86.7)	<0.001

Data are expressed as no (%)



รูปที่ 4 การจัดเรียงของกรดอะมิโนในส่วนของ pre-S1/pre-S2 จากตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อ 14 คนที่มีการกลายพันธุ์ในส่วน pre-S ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย: เชียงราย (CR), ชลบุรี (CH), นครศรีธรรมราช (NK) และอุดรธานี (UD)[24]

ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 121-149 ที่เรียกว่า major antigenic determinant หรือ '*a*' determinant ซึ่งเป็นส่วนที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อ (protective antibody) ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและเป็นผลจากการได้รับวัคซีน

การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ S gene เป็นแบบ missense mutations ซึ่งเป็นการเปลี่ยนกรดอะมิโนหนึ่งตำแหน่งที่นิยมเรียกว่า 'vaccine escape' mutations เนื่องจากการกลายพันธุ์แบบนี้มีความสัมพันธ์กับการเคยได้รับการฉีดวัคซีนหรือ hepatitis B immunoglobulin (HBIG) ป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์แบบนี้อาจพบได้ในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน กลไกของการกลายพันธุ์ในส่วน S gene นี้จึงอาจเกิดจากแรงกดดันที่เกิดภายหลังจากการได้รับวัคซีน (selective pressure) หรืออาจเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ[8,28] ดังนั้นการกลายพันธุ์แบบนี้จึงพบได้บ่อยในประเทศที่มีความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีค่อนข้างสูงร่วมกับการได้รับวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสอย่างทั่วถึง (universal vaccination)

การกลายพันธุ์ของ S gene มีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 ซึ่งพบในผู้ที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อนโดยเป็นการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 145 จากไกลซีน (glycine, G) เป็นอาร์จินีน (arginine, R) (G145R) ซึ่งอยู่ในวง (loop) ที่ 2 ของ '*a*' determinant การศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าการกลายพันธุ์สามารถเกิดขึ้นได้ในตำแหน่งกรดอะมิโนอื่น ๆ ของ '*a*' determinant ได้เช่นเดียวกันที่พบได้บ่อยได้แก่ P127T,

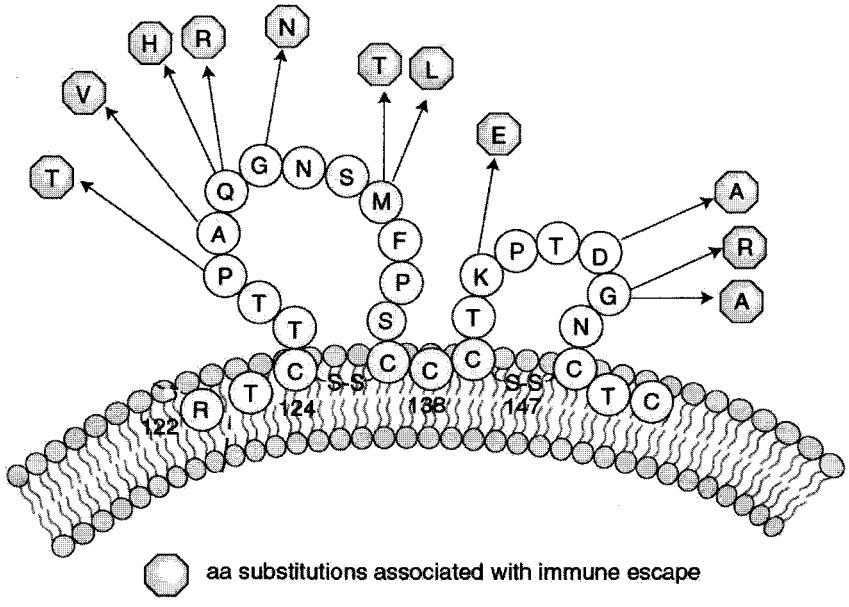
A128V, Q129H/R, G130N, M133L/T, K141E และ D144A/H อย่างไรก็ตาม G145R ยังเป็นรูปแบบของการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในส่วนของ '*a*' determinant (รูปที่ 5)[29] นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีนยังอาจพบในตำแหน่งอื่น ๆ ที่ไม่ได้อยู่ในส่วนของ '*a*' determinant เช่น P120S/T เป็นต้น

การศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยเมื่อปีพ.ศ. 2547 จากตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่รวบรวมจากโรงพยาบาลของรัฐใน 4 ภาคของประเทศพบว่าจำนวน 4 ใน 147 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.8) ที่ตรวจพบ HBV DNA ด้วยวิธี PCR มีการกลายพันธุ์ในส่วน '*a*' determinant เกิดขึ้นโดยเป็นการกลายพันธุ์แบบ T126A ทั้งหมดและไม่พบ G145R เลย การกลายพันธุ์แบบ T126A นี้พบในผู้ที่เคยฉีดวัคซีนร้อยละ 4.7 (2 ใน 43 ตัวอย่าง) และไม่เคยฉีดวัคซีนมาก่อนร้อยละ 1.9 (2 ใน 104 ตัวอย่าง) ซึ่งอัตราความชุกของการกลายพันธุ์ในทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์แบบ T126A นี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีน (ตารางที่ 4)[30] จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ในส่วน '*a*' determinant มีอัตราความชุกค่อนข้างต่ำในประชากรไทยเมื่อเทียบกับข้อมูลการศึกษาจากต่างประเทศเช่นการศึกษาในประเทศไต้หวันพบว่าอัตราความชุกของการกลายพันธุ์ในส่วน '*a*' determinant ในเด็กเพิ่มจากร้อยละ 7.8 ก่อนเริ่มมีการฉีดวัคซีนเป็นร้อยละ 23.1 หลังจากมีการฉีดวัคซีนอย่างทั่วถึงแล้ว 15 ปี[31]

ความสำคัญในทางคลินิกของการกลายพันธุ์ในส่วน '*a*' determinant ยังไม่ชัดเจนเพราะพบได้ในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั่ว ๆ ไปไม่ว่าจะเคยได้รับวัคซีนมาก่อนหรือไม่ เนื่องจากการกลายพันธุ์ในส่วนนี้อาจทำให้ปฏิกิริยาตอบสนองของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ '*a*' determinant ลดลงเมื่อตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี EIA ที่ใช้กันทั่วไปซึ่งอาจทำให้ผลการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันไม่เป็นไปตามปกติในบางกรณี[32] ได้แก่

1. ตรวจพบ anti-HBc ให้ผลบวกอย่างเดียว (isolated anti-HBc positive) เนื่องจากอาจตรวจไม่พบ HBsAg ทั้ง ๆ ที่ยังมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

2. ตรวจไม่พบ HBsAg แต่ตรวจพบ HBeAg



รูปที่ 5 การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในส่วน '*a*' determinant ของไวรัสตับอักเสบบี (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 29)

ตารางที่ 4 ข้อมูลทางคลินิกและไวรัสวิทยาของผู้ติดเชื้อ 4 คน ที่มีการกลายพันธุ์ในส่วน "a" determinant [30]

	Age	Sex	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg (S/N)
NK652	33	M	C	adr	-	324.54
NK052	58	F	C	adr	-	374.06
NK110	13	F	C	adr	+	389.18
UD767	8	M	C	adr	+	268.64

3. ตรวจพบทั้ง HBsAgและ anti-HBs พร้อมกันซึ่งกรณีนี้มักมีระดับ anti-HBs ที่ค่อนข้างต่ำ

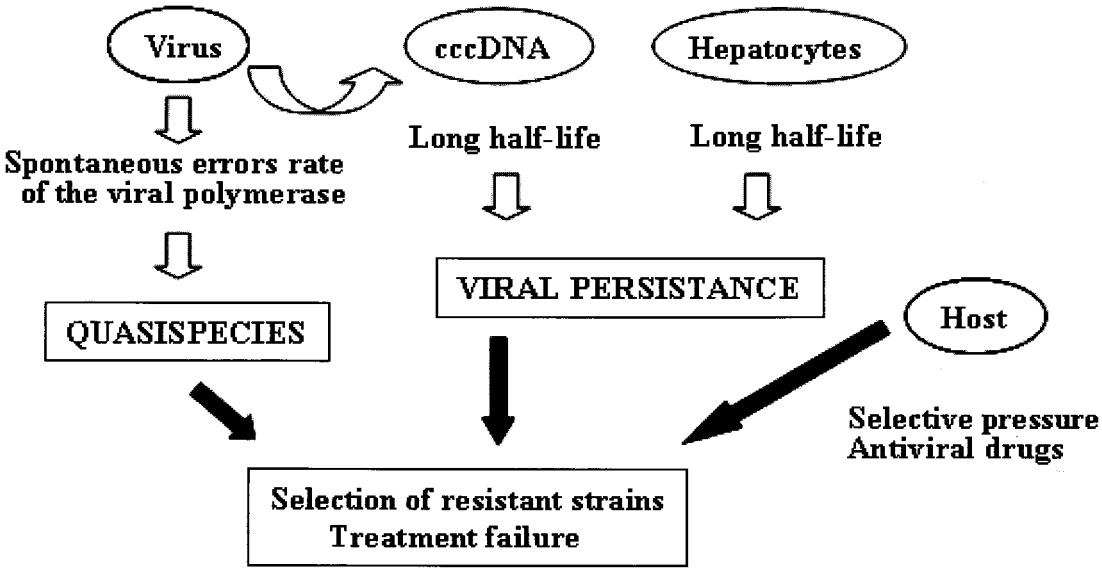
4. ผลการตรวจ HBsAg ไม่สอดคล้องกันเมื่อใช้ชุดการตรวจ HBsAg ที่มีความไวของการตรวจแตกต่างกัน

เนื่องจากเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์ในส่วนนี้สามารถเพิ่มจำนวนและถ่ายทอดไปยังผู้อื่นได้ตามปกติโดยไม่แตกต่างจากเชื้อไวรัสที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์นี้อาจเพิ่มความเสี่ยงของการติดต่อทางการให้เลือด (blood transfusion) เนื่องจากการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันอย่างเดียวอาจตรวจไม่พบ HBsAg โดยเฉพาะในประเทศที่มีอัตราความชุกของการกลายพันธุ์นี้สูงและยังไม่มีการตรวจกรองการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้บริจาคเลือด (blood donors) โดยใช้วิธี nucleic acid amplification technology (NAT) ซึ่งเป็นการตรวจหา HBV DNA วิธีหนึ่ง[33] อย่างไรก็ตามรายงานการติดต่อทางการให้เลือดของเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์นี้ยังมีค่อนข้างน้อยในปัจจุบัน

5. การกลายพันธุ์ของ polymerase gene (drug-resistance mutation)

ผู้ป่วยตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสกลุ่ม NA ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ในขบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เมื่อได้รับยาติดต่อกันเป็นเวลานานอาจมีการดื้อยา (drug resistance) เกิดขึ้น กลไกของการดื้อยานี้เกิดจากการกลายพันธุ์เพื่อปรับตัวให้อยู่รอดภายใต้แรงกดดันจากยาต้านไวรัส (adaptive mutations under selective pressure)[34, 35] โดยมีปัจจัยที่สำคัญ 6 ประการที่นำไปสู่การดื้อยาได้แก่ 1) อัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (viral replication rates) 2) อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงเนื่องจากกลไก reverse transcription ไม่มีการตรวจสอบความผิดพลาด (low fidelity of reverse tran-scription) 3) แรงกดดันจากการใช้ยาต้านไวรัส (selective pressure of the drug) 4) คุณสมบัติของยาต้านไวรัสที่มีอัตราการดื้อยาแตกต่างกัน (genetic barrier of the drug) 5) อัตราการหมุนเวียนการสร้างเซลล์ตับขึ้นใหม่ (hepa-tocyte turnover rate หรือ replication space) เพื่อรองรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่ดื้อต่อยา 6) ความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อไวรัสที่ดื้อต่อยา (fitness of the resistance strains)

รูปที่ 6 แสดงกลไกของการดื้อยาต้านไวรัสซึ่งมีกลไกโดยสังเขปดังนี้ เนื่องจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงอยู่แล้วตามธรรมชาติ ทำให้มีเชื้อไวรัสซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (he-terogeneity) อยู่ร่วมกันแบบหลากสายพันธุ์ (quasis-pecies) โดยประชากรส่วนใหญ่ (major population) เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ดื้อยา (wild-type strains) อยู่ร่วมกับเชื้อไวรัสส่วนน้อย (minor population) ที่มีการกลายพันธุ์ของ polymerase gene ในตำแหน่งที่ดื้อยาอยู่แล้วตั้งแต่ก่อนการรักษา การศึกษาในสัตว์ทดลอง (woodchuck model) พบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ดื้อยานี้เกิดขึ้นในระดับของ cccDNA ซึ่งทำหน้าที่เป็นต้นแบบ (template) สำหรับสร้างดีเอนเอและโปรตีนต่าง ๆ ของ

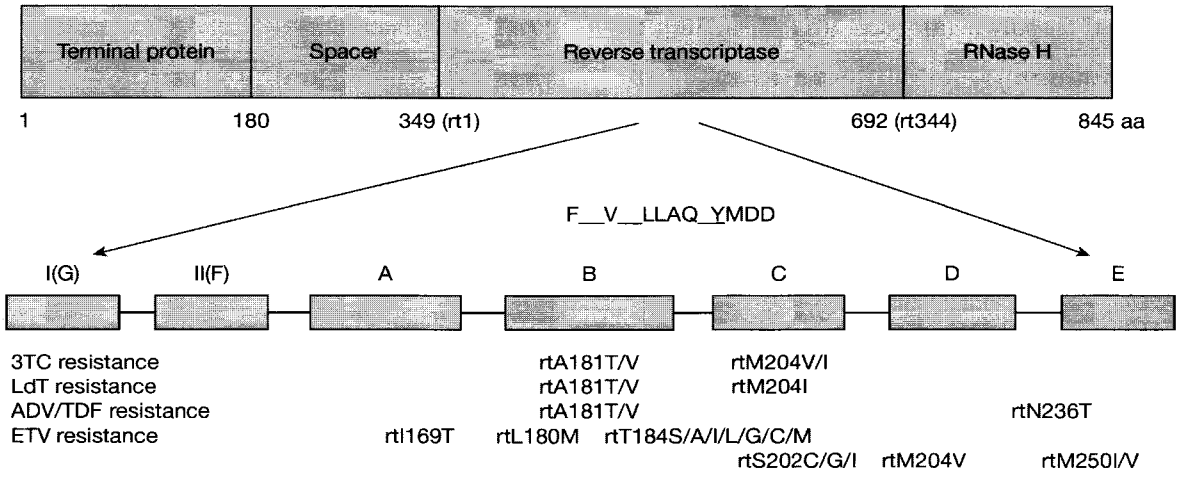


รูปที่ 6 กลไกของการดื้อยาต้านไวรัสของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 36)

เชื้อไวรัสที่อยู่ในเซลล์ตับและมีครึ่งอายุค่อนข้างยาว[36] เมื่อผู้ป่วยได้รับยาต้านไวรัสเป็นเวลานานทำให้เชื้อไวรัสที่ไม่ดื้อยาถูกยับยั้งและมีจำนวนลดลง ส่วนเชื้อไวรัสที่ดื้อยาซึ่งไม่ถูกยับยั้งมีโอกาสเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นประชากรส่วนใหญ่ในที่สุดทำให้ยาต้านไวรัสที่ใช้อยู่ได้ผลน้อยลงหรืออาจไม่ได้ผลเลยซึ่งเรียกว่ามีการดื้อยาเกิดขึ้น[34]

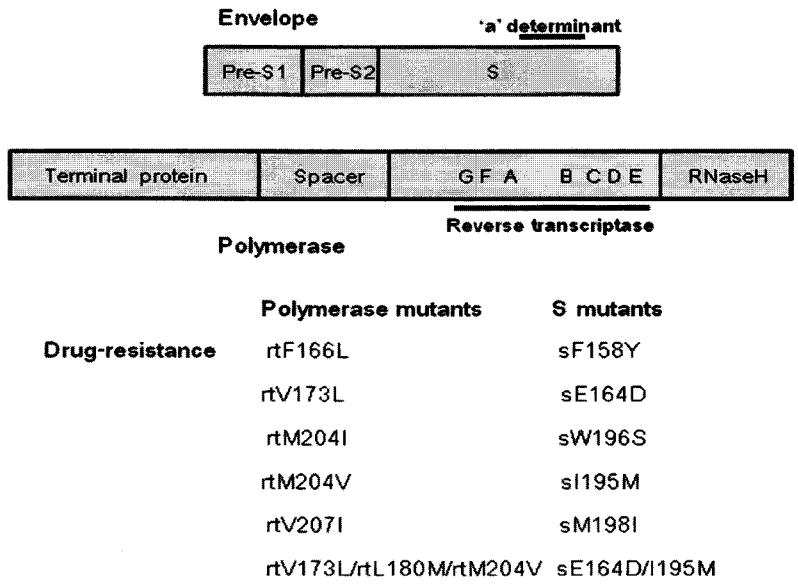
การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา NA มี 2 รูปแบบคือการกลายพันธุ์แบบปฐมภูมิ (primary mutations) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาชนิดนั้นโดยตรงและการกลายพันธุ์แบบทุติยภูมิ (secondary หรือ compensatory mutations) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามมาเพื่อทดแทนให้เชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ตามปกติเนื่องจากเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์แบบปฐมภูมิส่วนใหญ่มักมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนไวรัสที่ค่อนข้างต่ำ[37] นอกจากนี้ตำแหน่งของการกลายพันธุ์แบบ point mutations ยังแตกต่างกันระหว่างยาต้านไวรัสแต่ละชนิด[35] เช่นการดื้อยา lamivudine (3TC) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบปฐมภูมิที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 204 ซึ่งอยู่ใน tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) motif ในส่วนย่อย (domain) C ของ reverse transcriptase โดยการกลายพันธุ์เป็นแบบ rtM 204V/I และมีการกลายพันธุ์แบบทุติยภูมิในตำแหน่ง rtV173L และ rtL180M[38] ส่วนยา adefovir (ADV) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบ rtN236T และ/หรือ rtA 181T/V ในส่วน D และ B ของ polymerase ตามลำดับ การดื้อต่อ entecavir (ETV) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบ rtI169T, rtL180M และ rtM204V เป็นต้น ส่วนการดื้อต่อ telbivudine (LdT) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์แบบ rtM204I (รูปที่ 7)[35]

อัตราการดื้อยาขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการใช้ยาและชนิดของยาเช่น lamivudine มีอัตราการดื้อยาร้อยละ 24 และร้อยละ 75 เมื่อใช้ยานาน 1 และ 5 ปีตามลำดับ adefovir มีอัตราการดื้อยาประมาณร้อยละ 3 และ 29 ในปีที่ 2 และ 5 ตามลำดับส่วน entecavir มีอัตราการดื้อยาประมาณร้อยละ 1 ในปีที่ 5 ของการรักษา[35] อัตราการดื้อยาที่แตกต่างกันนี้เป็นเพราะยาแต่ละชนิดมี genetic barrier ที่แตกต่างกัน genetic barrier หมายถึงจำนวนของการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส (number of mutations) ที่เกิดขึ้นก่อนจะมีการดื้อยาเช่น lamivudine ซึ่งมี genetic



รูปที่ 7 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ใน polymerase gene ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านไวรัส (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 35)

barrier ที่ค่อนข้างต่ำเนื่องจากการกลายพันธุ์แบบปฐมภูมิที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 204 เพียงตำแหน่งเดียวของเชื้อไวรัสทำให้การตอบสนองต่อยาลดลงมากกว่า 1,000 เท่าขึ้นไป[39] ในขณะที่ entecavir ซึ่งเป็นยาที่มี genetic barrier สูงเนื่องจากต้องมีการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในหลาย ๆ ตำแหน่งร่วมกันก่อนที่จะมีการดื้อยาเกิดขึ้น[40]



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ polymerase ที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ HBsAg (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 35)

เนื่องจาก polymerase gene มีส่วนที่ซ้อนอยู่กับ S gene ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านไวรัสทำให้กรดอะมิโนของ HBsAg เปลี่ยนแปลงตามไปด้วยเช่นการกลายพันธุ์แบบ rtM204I และ rtM204V ซึ่งเกี่ยวข้องกับยา lamivudine ทำให้มีการกลายพันธุ์ใน HBsAg เป็นแบบ sW196S และ sI195M ตามลำดับ (รูปที่ 8)[35] นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาอาจมีผลทำให้ความสามารถของ '*a*' determinant ในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหรือ immunogenicity เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมและอาจมีการถ่ายทอดเชื้อที่มีการดื้อยาเหล่านี้ไปยังผู้อื่นรวมถึงผู้ที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อนซึ่งเรียกว่า antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants (ADAP-VEMs) ข้อมูลที่สนับสนุนสมมุติฐานนี้ได้จากการศึกษาในลิงชิมแพนซีที่พบว่าการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับยา lamivudine แบบ rtV173L ร่วมกับ rtL180M และ rtM204V ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ HBsAg แบบ sE164D และ sI195M สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์นี้ไปยังลิงชิมแพนซีตัวอื่นที่เคยได้รับการฉีดวัคซีนและมีภูมิต้านทานหรือ anti-HBs ในระดับที่สูงมาก่อน[41]

สรุป

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นเชื้อไวรัสชนิดดีเอนเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเนื่องจากมีการกลายพันธุ์ระดับยีนค่อนข้างสูงทั้งที่เกิดตามธรรมชาติหรือเป็นผลจากการได้รับวัคซีนหรือยาต้านไวรัส ตาราง 5 สรุปการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสแบบต่างๆ ที่พบได้บ่อยและความสัมพันธ์ในทางคลินิกของการกลายพันธุ์นั้นๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Ganem, D., and Prince, A.M. 2004. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. N Engl J Med 350: 1118-1129.
2. Kay, A., and Zoulim, F. 2007. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. Virus Res 127: 164-176.
3. Blum, H.E. 1995. Variants of hepatitis B, C and D viruses: molecular biology and clinical significance. Digestion 56: 85-95.
4. Lewin, S.R., Ribeiro, R.M., Walters, T., Lau, G.K., Bowden, S., Locarnini, S., and Perelson, A.S. 2001. Analysis of hepatitis B viral load decline under potent therapy: complex decay profiles observed. Hepatology 34: 1012-1020.
5. Locarnini, S., Shaw, T., Dean, J., Colledge, D., Thompson, A., Li, K., Lemon, S.M., Lau, G.G., and Beard, M.R.

ตารางที่ 5 สรุปการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่พบได้บ่อยและความสัมพันธ์ทางคลินิก

HBV genomic region	Mutations	Clinical association
Pre-core	G1896A	HBeAg negative mutants
BCP and enhancer II region	C1653T	Rapid disease progression
	A1753T	Rapid disease progression
	A1762T/G1764A	HBeAg negative mutants, Rapid disease progression and HCC
X	K130M/V131I	HCC development
Pre-S	Deletions	HCC development
S	'*a*' determinant	Vaccine escape mutants
Polymerase	in domains B,C and D	Resistance to nucleos(t)ide analogues

2005. Cellular response to conditional expression of the hepatitis B virus precore and core proteins in cultured hepatoma (Huh-7) cells. J Clin Virol 32: 113-121.

6. Milich, D.R., Jones, J.E., Hughes, J.L., Price, J., Raney, A.K., and McLachlan, A. 1990. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6599-6603.
7. Chotiyaputta, W., and Lok, A.S. 2009. Hepatitis B virus variants. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 6: 453-462.
8. Locarnini, S., and Omata, M. 2006. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. Liver Int 26 Suppl 2: 11-22.
9. Locarnini, S., McMillan, J., and Bartholomeusz, A. 2003. The hepatitis B virus and common mutants. Semin Liver Dis 23: 5-20.
10. Harrison, T.J. 2006. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. Semin Liver Dis 26: 87-96.
11. Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Jantaradsamee, P., Hirsch, P., Mahachai, V., Suwangool, P., and Poovorawan, Y. 2000. Core promoter and precore mutants of hepatitis B virus: prevalence and clinical relevance in chronic hepatitis patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health 31: 627-635.
12. Theamboonlers, A., Tangkijvanich, P., Jantaradsamee, P., Hirsch, P., and Poovorawan, Y. 1999. Prevalence of core promotor and precore mutants of hepatitis B virus in thailand by RFLP and sequencing. Southeast Asian J Trop Med Public Health 30: 750-755.
13. Schaefer, S. 2005. Hepatitis B virus: significance of genotypes. J Viral Hepat 12: 111-124.
14. Tong, M.J., Blatt, L.M., Kao, J.H., Cheng, J.T., and Corey, W.G. 2007. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. Liver Int 27: 1356-1363.
15. Yang, H.I., Yeh, S.H., Chen, P.J., Iloeje, U.H., Jen, C.L., Su, J., Wang, L.Y., Lu, S.N., You, S.L., Chen, D.S., et al. 2008. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 100: 1134-1143.
16. Hunt, C.M., McGill, J.M., Allen, M.I., and Condreay, L.D. 2000. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. Hepatology 31: 1037-1044.
17. Malmassari, S.L., Deng, Q., Fontaine, H., Houitte, D., Rimlinger, F., Thiers, V., Maillere, B., Pol, S., and Michel, M.L. 2007. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. Hepatology 45: 1199-1209.
18. Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W., and Harris, C.C. 2007. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. Oncogene 26: 2166-2176.
19. Liu, C.J., and Kao, J.H. 2008. Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy. Antivir Ther 13: 613-624.
20. Tangkijvanich, P., Sa-Nguanmoo, P., Mahachai, V., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. 2010. A case-control study on sequence variations in the enhancer II/ core promoter/precore and X genes of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatol Int.
21. Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.A., and Neuveut, C. 2009. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. Adv Cancer Res 103: 75-109.
22. Liu, C.J., and Kao, J.H. 2008. Core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma: story beyond A1762T/G1764A mutations. J Gastroenterol Hepatol 23: 347-350.
23. Huy, T.T., Ushijima, H., Win, K.M., Luengrojanakul, P., Shrestha, P.K., Zhong, Z.H., Smirnov, A.V., Taltavull, T.C., Sata, T., and Abe, K. 2003. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. J Clin Microbiol 41: 5449-5455.
24. Tangkijvanich, P., Komolmit, P., Mahachai, V., Sanguanmoo, P., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. 2009. Low pretreatment serum HBsAg level and viral

mutations as predictors of response to PEG-interferon alpha-2b therapy in chronic hepatitis B. J Clin Virol 46: 117-123.

25. Choi, M.S., Kim, D.Y., Lee, D.H., Lee, J.H., Koh, K.C., Paik, S.W., Rhee, J.C., and Yoo, B.C. 2007. Clinical significance of pre-S mutations in patients with genotype C hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 14: 161-168.
26. Chen, B.F., Liu, C.J., Jow, G.M., Chen, P.J., Kao, J.H., and Chen, D.S. 2006. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. Gastroenterology 130: 1153-1168.
27. Wang, H.C., Huang, W., Lai, M.D., and Su, I.J. 2006. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. Cancer Sci 97:683-688.
28. Weber, B. 2005. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. J Clin Virol 32: 102-112.
29. Weber, B. 2005. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. Expert Rev Mol Diagn 5: 75-91.
30. Suwannakarn, K., Tangkijvanich, P., Thawornsuk, N., Theamboonlers, A., Tharmaphornpilas, P., Yoocharoen, P., Chongsrisawat, V., and Poovorawan, Y. 2007. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes. Hepatol Res.
31. Hsu, H.Y., Chang, M.H., Ni, Y.H., and Chen, H.L. 2004. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. Gut 53: 1499-1503.
32. Badur, S., and Akgun, A. 2001. Diagnosis of hepatitis B infections and monitoring of treatment. J Clin Virol 21: 229- 237.
33. Kuhns, M.C., and Busch, M.P. 2006. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. Mol Diagn Ther 10: 77-91.
34. Fournier, C., and Zoulim, F. 2007. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: prevention of drug resistance. Clin Liver Dis 11: 869-892, ix.
35. Locarnini, S.A., and Yuen, L. 2010. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. Antivir Ther 15: 451-461.
36. Zhou, T., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Deslauriers, M., Condreay, L.D., and Mason, W.S. 1999. Emergence of drug-resistant populations of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine. Antimicrob Agents Chemother 43: 1947-1954.
37. Domingo, E. 2003. Quasispecies and the development of new antiviral strategies. Prog Drug Res 60: 133-158.
38. Chieochansin, T., Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Tangkijvanich, P., Komolmit, P., and Poovorawan, Y. 2006. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods. Tohoku J Exp Med 210: 67-78.
39. Seigneres, B., Pichoud, C., Martin, P., Furman, P., Trepo, C., and Zoulim, F. 2002. Inhibitory activity of dioxolane purine analogs on wild-type and lamivudine-resistant mutants of hepadnaviruses. Hepatology 36: 710-722.
40. Colonno, R.J., Rose, R., Baldick, C.J., Levine, S., Pokornowski, K., Yu, C.F., Walsh, A., Fang, J., Hsu, M., Mazzucco, C., et al. 2006. Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B. Hepatology 44: 1656-1665.
41. Kamili, S., Sozzi, V., Thompson, G., Campbell, K., Walker, C.M., Locarnini, S., and Krawczynski, K. 2009. Efficacy of hepatitis B vaccine against antiviral drug-resistant hepatitis B virus mutants in the chimpanzee model. Hepatology 49: 1483-1491.